昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，March 2008，51(3)：237 – 245 ISSN 0454-6296

家蚕 P450 基因 *CYP18A1* 的克隆、序列分析及转录活性

艾均文，王根洪，李艳红，余泉友，张学松，朱 勇*，向仲怀*

(西南大学生物技术学院，西南大学蚕学与系统生物研究所，农业部蚕桑学重点开放实验室，重庆 400716)

摘要：蜕皮激素对昆虫生长、发育和繁殖有重要调控作用，尤其对蜕皮和变态过程。利用 GenBank 上登录的蜕皮激素 C_{26} 羟基化酶候选基因 *CYP18A1* 的氨基酸序列对家蚕 *Bombyx mori* 全基因组数据库进行 BLASTP 比对，发现了家蚕直向同源基因(ortholog)，其完全编码序列经 RT-PCR 检测和克隆、测序验证后，再以此为信息探针检索家蚕表达序列标签(expressed sequence tags，EST)数据库进行拼接延伸，获得了一条包括 5′非翻译区在内的长度为 1 737 bp 的 cDNA 序列，验证结果也表明与电子克隆序列完全一致(GenBank 登录号为 EF421988，P450 命名委员会将其命名为 *CYP18A1*)。该基因的开放阅读框为 1 623 bp，编码 541 个氨基酸，含有包括 P450s 特征结构域在内的所有昆虫 P450 基因的 5 个保守结构域，其推定的分子量为 61.67 kD，等电点为 8.54。将该基因 cDNA 序列与家蚕基因组序列进行比对，结果表明该基因具有 6 个外显子，5 个内含子，外显子/内含子边界符合经典的 GT-AG 规则。同源性分析也发现家蚕 *CYP18A1* 与其他昆虫的直向同源基因具有较高相似性。用 RT-PCR 方法对家蚕主要发育变态时期与组织进行检测，显示出该基因的转录表达不仅具有时空特异性，而且在表达时期上与已报道的蚕体内蜕皮激素含量变化有紧密的一致性。该研究进一步证实了 *CYP18A1* 基因与昆虫体内蜕皮激素代谢平衡相关联。

关键词：家蚕；细胞色素氧化酶；*CYP18A1* 基因；克隆；序列分析；转录活性

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)03-0237-09

Molecular cloning, sequence analysis and transcriptional activity determination of cytochrome P450 gene *CYP18A1* in the silkworm, *Bombyx mori*

AI Jun-Wen, WANG Geng-Hong, LI Yan-Hong, YU Quan-You, ZHANG Xue-Song, ZHU Yong*, XIANG Zhong-Huai* (Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Institute of Sericulture and Systems Biology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Fundamental events in the life of insects such as growth, development and reproduction are regulated by ecdysteroids (molting hormone), especially during molting and metamorphosis. The available amino acid sequences from GenBank of the orthologous *CYP18A1* genes, which are candidates for the ecdysone 26-hydroxylase, was used to BLAST search against the silkworm genomic sequences database, and an ortholog in *Bombyx mori* was identified. In order to obtain full-length cDNA in *B. mori*, we used this sequence as a probe and performed in silico cloning based on the *B. mori* EST database. A contig containing 1 737 bp was assembled on the basis of several ESTs, which extended into 5′-UTR. It was then verified by RT-PCR. PCR product was purified and ligated into pMD18-T vector. The recombinant clones were sequenced, which had the same sequence as the predictive contig. It contains an ORF of 1 623 bp encoding 541 amino acids, termed as *B. mori CYP18A1* by the P450 nomenclature committee (GenBank accession number: EF421988). It shares high identities with other orthologs, with its deduced mass 61.67 kD and isoelectric point 8.54. The five

---

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目(2005CB121000)；国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A117)；教育部博士学科点专项基金(20060635008)

作者简介：艾均文，男，1968 年生，湖南人，博士研究生，副研究员，研究方向为蚕桑种质资源与分子生物学，E-mail：jwai718@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：zhuy@swu.edu.cn；xbxzh@swu.edu.cn

收稿日期 Received：2007-08-28；接受日期 Accepted：2007-11-12

conserved motifs of insect P450 enzymes including signature heme-binding region of P450s are present. An alignment of the cDNA sequence with the silkworm genome sequences revealed that there were 6 exons and 5 introns in this gene, and all of them conformed the canonical GT-AG rule. The result of RT-PCR revealed that *B. mori CYP18A1* not only showed a temporal and tissue-specific expression profile, but also exhibited a distinct expression pattern which closely coincided with the reported peak of ecdysteroid in the haemolymphs of *B. mori*. This further suggests orthologous *CYP18A1* gene in insects is closely related to ecdysteroid homeostasis.

Key words: *Bombyx mori*; cytochrome P450; *CYP18A1* gene; gene cloning; sequence analysis; transcriptional activity

细胞色素 P450 酶系又称作多功能氧化酶(MFO),是广泛存在于所有需氧生物体中的一类代谢酶系(Scott,1999),具有底物广泛性和功能多样性的特点,因其生物学的重要性,一直是生物学研究的一个重要对象(Omura,1999)。细胞色素 P450 基因起源于 35 亿年前的一个共同祖先,是最古老和最庞大的超基因家族之一(Nelson *et al*.,1993),在生命的过程中,它对内源物质的代谢与转化或外源化合物的活化与降解等进行催化和调控。它在昆虫中的作用涉及生长、发育、取食等过程,其对异生物质的代谢特性导致了昆虫对杀虫剂的抗药性和对植物有毒物质的耐受性,它还参与了昆虫体内保幼激素、蜕皮激素和脂肪酸等内源化合物的合成与代谢(Scott *et al*.,1998;Feyereisen,1999)。

蜕皮激素对昆虫生长、发育和繁殖有重要调控作用,尤其对蜕皮和变态过程。植食性昆虫是将摄取食物中的植源性甾醇经过多步酶促催化过程,生成不同的前体,最终合成蜕皮激素(Gilbert,2004;Parvy *et al*.,2005;Rewitz *et al*.,2006a)。其中,已有研究表明在 20-羟基蜕皮酮前体的转换过程中,不同 Halloween 家族基因编码的昆虫细胞色素 P450 单加氧酶参与了最后的 4 步酶促催化过程。分别是蜕皮激素的 C_{25} 羟基化酶(*CYP306A1*, *Phantom*: *Phm*)(Niwa *et al*.,2004;Warren *et al*.,2004);C_{22} 羟基化酶(*CYP302A1*, *Disembodied*: *Dib*)(Chavez *et al*., 2000;Niwa *et al*.,2005);C_2 羟基化酶(*CYP315A1*, *Shadow*: *Sad*)(Warren *et al*.,2002);使 α-蜕皮酮转化成 β-蜕皮酮的 P450 酶是蜕皮酮 20-单加氧酶(*CYP314A1*, *Shade*: *Sha*)(Petryk *et al*.,2003;Rewitz *et al*., 2006b)。最近通过黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Halloween 家族突变基因 *Spook* 的初步研究表明,该基因也参与了 C_{25} 羟基化酶底物 2,22,25-三脱氧蜕皮酮的某一前体合成,经克隆测序确定其为又一新的昆虫细胞色素 P450 基因(*CYP307A1*, *Spook*: *Spo*)(Namiki *et al*.,2005;Ono *et al*.,2006;Rewitz *et al*.,2007)。

昆虫细胞色素 P450 基因不仅参与了蜕皮激素的合成,而且还参与了蜕皮激素的代谢(Nebert and Gonzalez,1987)。蜕皮激素活性降低与消失的主要途径之一是 20-羟基蜕皮酮因 C_{26} 的进一步羟基化形成 26-蜕皮酸而失活(Lafont *et al*.,1983;Chen *et al*.,1994),并随后继续氧化变成醛和羧酸(Williams *et al*.,1997;Feyereisen,2005)。Wing 等(1988)首先研究发现,非甾醇兴奋剂 RH-5849 和蜕皮激素一样作用于表皮的蜕皮激素受体,引起虫体形成早熟、异常的致死蜕皮。Williams 等(2000)进一步通过对烟草天蛾注射非甾醇兴奋剂 RH-5849 与蜕皮激素,发现在中肠的线粒体和微粒体中的 C_{26} 羟基化酶活性只有在注射诱导后才可被检测,而可诱导性是 P450 的一个特征。Hurban 等(1993)通过蜕皮激素对黑腹果蝇进行诱导,结合 cDNA 消减杂交技术得到一个与蜕皮激素代谢有关的基因 *Eig*-17,并根据序列特征确定其为 P450 基因。Bassett 等(1997)以该基因的片段为探针从黑腹果蝇的 cDNA 文库中克隆到一个全长的 P450 新家族基因 *CYP18A1*,该基因转录水平的波动和黑腹果蝇体内的蜕皮激素表达水平的变化有相当高的一致性,推断 *CYP18A1* 应是编码 C_{26} 羟基化酶的候选 P450 基因。Davies 等(2006)根据 P450 基因的保守结构域序列设计简并引物,克隆得到鳞翅目昆虫海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的直向同源基因 *CYP18A1*,进而通过 Northern 杂交分析,其末龄幼虫在非甾醇兴奋剂 RH-5992 所诱导下,该基因在中肠和脂肪体中可明显地被诱导转录表达,进一步支持了蜕皮激素是 *CYP18A1* 的调控因子及其作为编码 C_{26} 羟基化酶候选 P450 基因的推断。

家蚕 *Bombyx mori* 是遗传学上具有重要地位的模式生物,也是国际鳞翅目基因组协会确定的鳞翅目昆虫的代表(Li *et al*.,2005),对其生长发育调控

研究具有重要意义。目前，对已知与昆虫蜕皮激素合成相关的 5 个直向同源 P450 基因（orthologs）得到了克隆和功能的初步研究（Niwa *et al*.，2004，2005；Namiki *et al*.，2005；Rewitz *et al*.，2006c），而对与蜕皮激素代谢有关的 P450 基因研究尚未见报道。我们根据 GenBank 已登录的 *CYP18A1* 基因序列、家蚕 EST 序列及家蚕全基因组序列对家蚕的 *CYP18A1* 进行了生物信息学分析、克隆与测序，并研究了其在家蚕不同的主要发育变态时期和组织的表达谱，为进一步研究该基因的功能及家蚕蜕皮激素的代谢调控提供了参考和依据。

1　材料与方法

1.1　家蚕 *CYP18A1* 基因的生物信息学分析

家蚕基因组和 EST 序列均来自 SilkBase 数据库（http://silkworm. genomics. org. cn /index. jsp）。从 NCBI（http://www. ncbi. nlm. nih. gov/）下载黑腹果蝇（CAL69940）、海灰翅夜蛾（CAJ31114）、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（EAT43716）、西方蜜蜂 *Apis mellifera*（XP_393885）、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（XP_968393）与拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura*（XP_001354384）等的 *CYP18A1* 基因的氨基酸序列，与家蚕全基因组预测基因的氨基酸序列进行 BLASTP 比对，得到家蚕中直向同源基因。进一步以经克隆验证的预测基因编码序列为信息探针，对家蚕 EST 库进行本地 BLASTN 检索，参数标准设置为 E≤e-30。检出与编码序列同源性较高或有部分重叠的 EST 序列，利用 DNAStar 软件把检出序列首尾拼接，组装为连续体（contig），经反复检索拼接，尽可能获得最大片段的连续体。推定的 P450 基因蛋白质多序列比对采用 ClustalX 1.83。

1.2　实验材料

以西南大学家蚕基因库保存的华系二化性品种大造（P50）为实验材料，在正常情况下饲育。取 5 龄（末龄）幼虫至化蛹这一家蚕主要发育变态时期每一天的中肠及幼虫 5 龄第 3 天的各组织器官，用生理盐水和 DEPC 水冲洗后储存于液氮中备用。

1.3　RNA 提取和引物设计

TRIzol Reagent（Invitrogen）试剂提取家蚕总 RNA，经 DNase Ⅰ（RNase Free）处理后用 M-MLV 反转录酶（TaKaRa）反转录得到 cDNA 第一链，并以此为模板进行 PCR 扩增，所有步骤均按试剂的使用说明书进行。引物设计采用 Primer Primer 5.0，引物序列为：F1：5′-CGGTCGACATGATAACTATGCTTACGAATTCGAA-3′（下划线部分为 *Sal* Ⅰ 位点，阴影部分为起始密码子），R1：5′-CGCTCGAGTTAATGTGAGCCGACATGACGAA-3′（下划线部分为 *Xho* Ⅰ 位点，阴影部分为终止密码子）；F2：5′-CGTCGCATGCTCGCGATCTA-3′，R2：5′-TGCTGGGACGACCGGTGAAT-3′。

1.4　家蚕 *CYP18A1* 基因的克隆与测序

用家蚕中肠 cDNA 为模板，以根据该基因的编码序列设计一对引物 F1/R1，进行 RT-PCR 扩增，反应条件为 94℃，5 min 预变性后，94℃，30 s 变性，58℃，50 s 退火，72℃，1 min 30 s 延伸，共 35 个循环，72℃终延伸 10 min，4℃保存。此外，还以引物 F2/R2 检测 5′端的预测序列，RT-PCR 扩增的反应条件则变为：56℃，40 s 退火，72℃，1 min 延伸。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳并回收纯化，进行 TA 克隆（pMD18-T 载体，TaKaRa），连接产物转化至 JM109 感受态菌株后，涂布于加有氨苄青霉素、IPTG、X-gal 的平板上，培养 12～14 h，挑取白色单菌落于 LB 液体培养基中培养。用碱裂解法抽提质粒，电泳检测滞后质粒并对其进行双酶切鉴定。测序由 Invitrogen 公司完成。

1.5　家蚕 *CYP18A1* 基因的转录活性研究

为了解该基因在不同组织与不同发育阶段的表达情况，选取 5 龄第 1 天到化蛹阶段的每一天中肠及 5 龄幼虫第 3 天各组织器官等共 20 个点进行调查，提取 RNA 后进行 RT-PCR 扩增。以家蚕 *A3* 基因（NCBI 登录号 BMU49854）作内参照，用半定量 RT-PCR 方法予以检测。特异检测引物：F3：5′-CGCTGCAGATCGAGAAGGCGAAGAGC-3′（下划线部分为 *Pst* Ⅰ 位点），R3：5′-CGCTCGAGCCCTCCAGCGAAGGTAAT-3′（下划线部分为 *Xho* Ⅰ 位点），扩增长度为 620 bp。根据内参照基因的表达量将家蚕各组织时期的 cDNA 浓度调整一致后，按如下反应条件进行检测，即：94℃，5 min 预变性后，94℃，30 s 变性，63℃，40 s 退火，72℃，1 min 延伸，共 34 个循环，72℃终延伸 10 min，4℃保存。反应产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

2　结果与分析

2.1　家蚕 *CYP18A1* 基因序列的拼接与克隆测序

为了得到较为完整家蚕的 *CYP18A1* 直向同源基因及其转录表达证据，利用 BLASTP 程序对家蚕全基因组的蛋白质库进行比对，并根据预测基因的

编码序列设计一对引物 F1/R1 进行 PCR 扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析在 1 650 bp 左右处出现了一条与预计大小相一致的特异带（图 1）。该 cDNA 序列经克隆测序后，最终得到了与预测相同的具有完整编码框的核酸序列。再以此序列为信息探针，对家蚕 EST 库进行检索，延伸拼接出了一条包括 5′-UTR 在内更长的 cDNA 序列，其长度为 1 737 bp，并得到了引物 F2/R2 扩增克隆测序验证，提交 P450 基因命名委员会，被命名为 *CYP18A1*（GenBank 登录号 EF421988）。

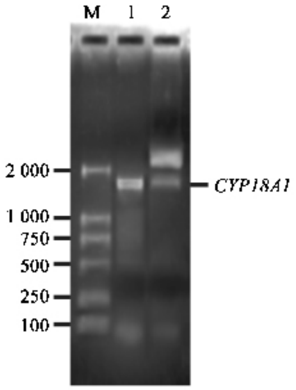

图 1 家蚕 *CYP18A1* 基因的 RT-PCR 扩增和质粒酶切鉴定

Fig. 1 RT-PCR of *CYP18A1* and identification of TA clone

M：DNA 标准 DNA marker（DL2000）；1：重组质粒酶切 Recombinant plasmid DNA digested with *Sal* Ⅰ and *Xho* Ⅰ；2：RT-PCR 产物 RT-PCR product.

2.2 家蚕 *CYP18A1* 基因的 cDNA 及预测蛋白质序列分析

克隆得到的家蚕 *CYP18A1* 基因的开放阅读框（112～1 734）为 1 623 bp，该基因编码 541 个氨基酸（图 2），通过 Expasy 网站（http://ca.expasy.org/tools/）预测得出其蛋白质分子量和等电点分别为 61.67 kD 和 8.54。该基因的氨基酸残基中含有昆虫 P450 蛋白的 5 个保守结构域（图 3）（Feyereisen，2005），如：$W_{\times\times\times}R$（螺旋 C，138～142），$AG_{\times}E/DT$（螺旋 Ⅰ，326～330），$E_{\times\times}R$（螺旋 K，383～386），$P_{\times\times}F_{\times}P_{\times}RF$（PERF，433～441），$PF_{\times\times}G_{\times}R_{\times}C_{\times}G$（血红素结合区，456～466），而且这些保守结构域，特别是与分子氧结合的功能活性位点螺旋 Ⅰ 及 P450 蛋白特有的血红素结合区，与其他昆虫的直向同源基因 *CYP18A1* 有相当高的同源性。该基因还在 N 端具有由脯氨酸-甘氨酸富集而成的高度疏水性质保守结构域（P/I）$PGP_{\times}$（P/G）$_{\times}$P，而这是微粒体 P450 基因的代表性特征（Bassett *et al*.，1997）。通过 NCBI 的 BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）程序进行蛋白质序列在线比对，结果表明：家蚕 *CYP18A1* 与海灰翅夜蛾、拟暗果蝇、黑腹果蝇、埃及伊蚊、西方蜜蜂及赤拟谷盗的蛋白质序列的相似性（identity）分别为 82%，63%，63%，60%，53%和 52%（图 3），由此可以看出家蚕 *CYP18A1* 和其他昆虫特别是鳞翅目昆虫的直向同源基因相似性较高。

2.3 家蚕 *CYP18A1* 基因结构分析

用 Sim4 程序（http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php/）对家蚕 *CYP18A1* 基因的外显子/内含子结构进行分析，表明该基因具有 6 个外显子，5 个内含子，且外显子/内含子边界均符合 GT-AG 规则（表 1）。

2.4 家蚕 *CYP18A1* 基因表达分析

提取家蚕未受精卵、5 龄 1～6 天的幼虫中肠，老熟幼虫（即将开始吐丝的蚕）中肠，上簇营茧 1 天的中肠、2 天的中肠与脂肪体，预化蛹及 5 龄第 3 天幼虫的头部、中肠、脂肪体、体壁、血液、精巢、卵巢与丝腺等各组织器官 RNA，进行 RT-PCR 扩增，结果表明：该基因在本次实验检测的家蚕不同时期和组织中存在表达特异性。组织中的血液与丝腺不表达，而在所调查发育时期的 5 龄上簇营茧第 2 天有一个转录表达的相对峰值（图 4）。这与本所家蚕全基因组基因芯片检索结果基本一致（Xia *et al*.，2007；http://silkworm.swu.edu.cn/microarray/）。

表 1 家蚕 *CYP18A1* 基因序列内含子/外显子位点（3′端非翻译区除外）

Table 1 Intron/exon sites of *CYP18A1* in silkworm (3′ untranslated region excepted)

外显子序号及长度（bp）Exon no. and size	cDNA	基因组 Scaffold 007417 genomic DNA	受位 3′ accepter	供位 5′ donor	内含子序号及长度（bp）Intron no. and size
1（496）	1－496	13 111－12 616	tgcag/GCATC	TCTTG/gtaag	1（212）
2（122）	497－618	12 403－12 282	tttag/AATGA	TCAAG/gtttg	2（107）
3（225）	619－843	12 174－11 950	tttag/TATCT	ATAAT/gtaag	3（330）
4（205）	844－1 048	11 619－11 415	tttag/AATTA	TCATG/gtaag	4（90）
5（265）	1 049－1 313	11 324－11 060	tttag/GGATG	ACTAG/gtaag	5（86）
6（424）	1 314－1 737	10 973－10 550			

```
1     cagtgttctgacgtcgcatgctcgcgatctacgttccgcgcacgcatgtttcgtttcgtctgaacgaaaagttaatttttatttaaa
                                   F2                    F1
88    aaaaaaaaaaacaaatcagtaaaaATG ATA ACT ATG CTT ACG AAT TCG AAA ATT CTG TGG GCG CTT TGG CAA
1                             M   I   T   M   L   T   N   S   K   I   L   W   A   L   W   Q
160   GTG ATG AAC TAT TGT GTA TCT CGT ACG TCG GTG ATG CTG ATC ATT GTA ACC TGC ACG GCG TTG TTG
17    V   M   N   Y   C   V   S   R   T   S   V   M   L   I   I   V   T   C   T   A   L   L
226   TTG ACT CAA TTC CTG AAG CTA GTA CGT GAC ATT CGC AAG TTG CCC CCG GGA CCG TGG GGA CCA CCC
39    L   T   Q   F   L   K   L   V   R   D   I   R   K   L   P   P   G   P   W   G   P   P
292   GTC GTC GGC TAC CTA CCT TTT CTC GGA GTC CGG CAC AAG ACG TTC CTT CAA TTG GCC AGA AAC TAT
61    V   V   G   Y   L   P   F   L   G   V   R   H   K   T   F   L   Q   L   A   R   N   Y
358   GGA GCT CTC TTC TCT GCG CGA CTC GGA AAC CAA TTG ACC ATC GTT ATG AGT GAC TAC AAA ATT ATC
83    G   A   L   F   S   A   R   L   G   N   Q   L   T   I   V   M   S   D   Y   K   I   I
                                            R2
424   AGA GAA GCC TTC CGA CGC GAA GAA TTC ACC GGT CGT CCC AGC ACT CCC TTA ATG CAT ACT TTA GAT
105   R   E   A   F   R   R   E   E   F   T   G   R   P   S   T   P   L   M   H   T   L   D
490   GGT CTT GGC ATC ATC AAT AGC GAG GGC CGC CTC TGG AAA AAT CAA CGA CGG TTC TTG CAC GAA AAA
127   G   L   G   I   I   N   S   E   G   R   L   W   K   N   Q   R   R   F   L   H   E   K
556   CTA CGG GAG TTC GGC ATG ACT TAC ATG GGA AAC GGC AAA AAA CTA ATG GAG GAT AGA ATC AAG AAT
149   L   R   E   F   G   M   T   Y   M   G   N   G   K   K   L   M   E   D   R   I   K   N
622   GAA ATC CAC GAG CTG ATT GTA AGC CTG CAT CGA GCG CAA GGC GCA CCT ATT GAC GTA AAT CCT CTC
171   E   I   H   E   L   I   V   S   L   H   R   A   Q   G   A   P   I   D   V   N   P   L
688   CTT GCG CTG TGC GTG TCC AAC GTT ATC TGC GGT ATC ACG ATG TCG GTC CGT TTT AGT AAC GGC GAT
193   L   A   L   C   V   S   N   V   I   C   G   I   T   M   S   V   R   F   S   N   G   D
754   GTA CGC TTC GAG AGA CTC AAT CAT CTT ATC GAA GAA GGA ATG AGA CTT TTC GGA GAA GTT CAC TAC
215   V   R   F   E   R   L   N   H   L   I   E   E   G   M   R   L   F   G   E   V   H   Y
820   GGA GAA TAC ATT CCT CTG TAT AAT TAT CTA CCT GGA AAA GCT CTA GCT CAA GAA AAG GTC GCA AAA
237   G   E   Y   I   P   L   Y   N   Y   L   P   G   K   A   L   A   Q   E   K   V   A   K
886   AAT CGC GAT GAA ATG TTC GCG TTC TAT CAA ACA TTG ATA GAC GAG CAC CGC GAA ACT CTG GAC ATC
259   N   R   D   E   M   F   A   F   Y   Q   T   L   I   D   E   H   R   E   T   L   D   I
                                                                F3
952   AAT AAT GCC AGA GAC CTT ATC GAT GTC TAC TTA ATT GAA ATC GAG AAG GCG AAG AGC GAG GGC AGG
281   N   N   A   R   D   L   I   D   V   Y   L   I   E   I   E   K   A   K   S   E   G   R
1018  GCC GGC GAA CTC TTC GAA GGA AGA GAT CAT GAA TTA CAA TTA AAA CAA ATA CTT GGA GAT CTT TTC
303   A   G   E   L   F   E   G   R   D   H    E  L   Q   L   K   Q   I   L   G   D  L   F
1084  TCT GCT GGT ATG GAA ACC ATA AAG TCG TCG CTT CTG TGG ATG ATA GTA TTC ATG TTG CGA AAC CCA
325   S   A   G   M   E   T   I   K   S   S   L   L   W   M   I   V   F   M   L   R   N   P
1150  GAC GTG AAA AGG CGT GTA CAA GAA GAA CTC GAT GCG GTC ATT GGC CGA GAA CGT CTC CCT TCT ATT
347   D   V   K   R   R   V   Q   E   E   L   D   A   V   I   G   R   E   R   L   P   S   I
1216  GAC GAC ATA TCT AGT CTT CCA TAC ACC GAA ACT ACA ATT TTG GAA ACG CTA AGA TTA TCA AGC ATT
369   D   D   I   S   S   L   P   Y   T   E   T   T   I   L   E   T   L   R   L   S   S   I
1282  GTT CCT TTG GCA ACC ACA CAT TCT CCG ACT AGG GAT GTG CAA ATC AAC GGC TAT AAG ATT CCG GCG
391   V   P   L   A   T   T   H   S   P   T   R   D   V   Q   I   N   G   Y   K   I   P   A
1348  GGT TCT CAG GTT ATA CCA CTT ATT AAC TGC GTG CAC ATG GAT CCG AAT CTC TGG GAT GAA CCA AAC
413   G   S   Q   V   I   P   L   I   N   C   V   H   M   D   P   N   L   W   D   E   P   N
1414  AAA TTC AAT CCT AGT AGA TTC ATC GAC GCG ACC GGC AAG ATA AGA CGT CCG GAA TAT TTC ATG CCA
435   K   F   N   P   S   R   F   I   D   A   T   G   K   I   R   R   P   E   Y   F   M   P
1480 TTC GGG GTC GGC CGA AGA ATG TGT TTG GGC GAC GTA TTG GCC CGC AAA GAG ATG TTC ATG TTC TTT
457   F   G   V   G   R   R   M   C   L   G   D   V   L   A   R   K    E   M   F   M   F   F
                                                                          R3
1546  TCG TGT ATG ATG CAC CAA TTC GAC TTG GAA ATG GCT GAA GGT GAC GCA TTA CCT TCG CTG GAG GGC
479   S   C   M   M   H   Q   F   D   L   E   M   A   E   G   D   A   L   P   S   L   E   G
1612  ATA GTA GGT GCT ACA ATT GCA CCG AAA GCT TTT CGT  GTG AAA TTT TTG GCT CGT TCA CCA GTA CCC
501   I   V   G   A   T   I   A   P   K   A   F   R   V   K   F   L   A   R   S   P   V   P
                                                            R1
1678  CTA GTA CCG ACT ACG CTC TCT GCA GAT AGC TCT CAT CTT CGT CAT GTC GGC TCA CAT TAA
523   L   V   P   T   T   L   S   A   D   S   S   H   L   R   H   V   G   S   H   *
```

图 2　家蚕 *CYP18A1* 基因的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2　The cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of *CYP18A1* from *Bombyx mori*

F1 ~ F3 及 R1 ~ R3 分别表示上游和下游引物的位置，* 表示终止密码子。The F1 – F3 and R1 – R3 positions represent the upward and downward primer, respectively; the stop codon is indicated by asterisk.

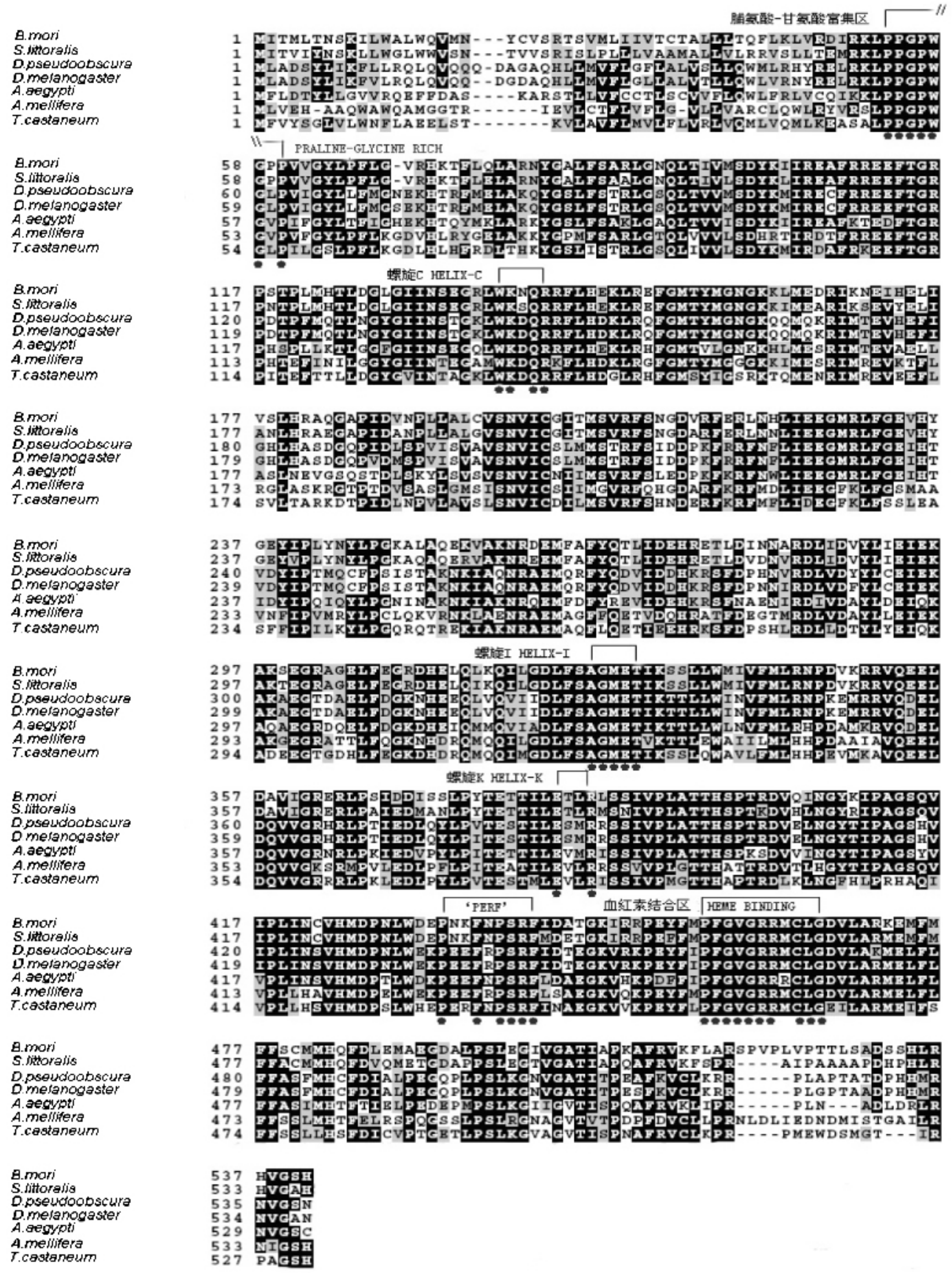

图 3 家蚕 *CYP18A1* 基因的氨基酸序列和其他直向同源基因的同源性比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *CYP18A1* from *Bombyx mori* with other orthologs

B. mori：**家蚕** *Bombyx mori*；*S. littoralis*：**海灰翅夜蛾** *Spodoptera littoralis*；*D. pseudoobscura*：**拟暗果蝇** *Drosophila pseudoobscura*；*D. melanogaster*：**黑腹果蝇** *Drosophila melanogaster*；*A. aegypti*：**埃及伊蚊** *Aedes aegypti*；*A. mellifera*：**西方蜜蜂** *Apis mellifera*；*T. castaneum*：**赤拟谷盗** *Tribolium castaneum*. **绝对保守的氨基酸用黑框，性质相似的氨基酸用阴影表示。由脯氨酸-甘氨酸富集组成的结构域，5 个昆虫** P450 **蛋白的保守结构域**：$W_{\times\times\times}R$(**螺旋** C)、$AG_{\times}E/DT$(**螺旋** Ⅰ)、$E_{\times\times}R$(**螺旋** K)、$P_{\times\times}F_{\times}P_{\times}RF$(PERF)、$PF_{\times\times}G_{\times}R_{\times}C_{\times}G$(**血红素结合区**)**均在图中标示。保守结构域中完全保守氨基酸残基用圆点注明。** Black boxes denote absolutely conserved residues while amino acids with similar properties are shaded. Shown are praline-glycine (P/G) rich region and the conserved motifs of insect P450 protein：$W_{\times\times\times}R$(Helix-C)，$AG_{\times}E/DT$(Helix-I)，$E_{\times\times}R$(Helix-K)，$P_{\times\times}F_{\times}P_{\times}RF$(PERF)，$PF_{\times\times}G_{\times}R_{\times}C_{\times}G$(Heme-binding). Residues in structural P450 motifs that are conserved in all seven orthologs are indicated by dots.

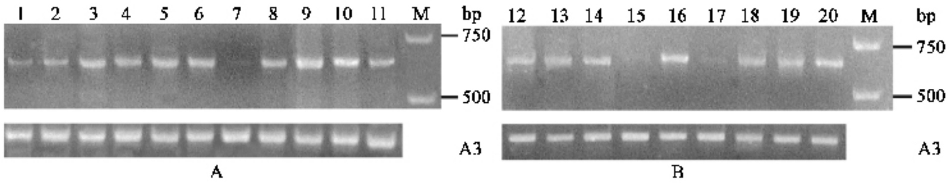

图 4　*CYP18A1* 基因在家蚕不同时期不同组织 RT-PCR 扩增产物的电泳图

Fig. 4　Identification of the PCR product of *CYP18A1* expressed in different tissues and at developmental stages of *Bombyx mori*

A：家蚕 5 龄幼虫第 1 天至化蛹发育时期的表达 Development-specific expression of *CYP18A1* at stages from day-1 fifth instar larvae to pupation；B：家蚕 5 龄第 3 天的组织及未受精卵的表达 Tissue-specific expression of *CYP18A1* in different tissues of day-3 fifth instar larvae including unfertilized egg；M：DNA 标准 DNA marker（DL2000）；1：5 龄第 1 天中肠 Midgut of day-1 fifth instar larvae；2：5 龄第 2 天中肠 Midgut of day-2 fifth instar larvae；3：5 龄第 3 天中肠 Midgut of day-3 fifth instar larvae；4：5 龄第 4 天中肠 Midgut of day-4 fifth instar larvae；5：5 龄第 5 天中肠 Midgut of day-5 fifth instar larvae；6：5 龄第 6 天中肠 Midgut of day-6 fifth instar larvae；7：熟蚕中肠 Midgut of mature silkworm；8：上簇第 1 天中肠 Midgut of day-1 after wandering；9：上簇第 2 天中肠 Midgut of day-2 after wandering；10：上簇第 2 天脂肪体 Fat body of day-2 after wandering；11：预化蛹 Pre-pupa；12：未受精卵 Unfertilized egg；13：头 Brain；14：体壁 Body wall；15：血液 Blood；16：脂肪体 Fat body；17：丝腺 Silk gland；18：马氏管 Malpighian tubule；19：精巢 Testis；20：卵巢 Ovary.

3　讨论

昆虫细胞色素 P450 基因 *CYP18A1* 和蜕皮激素降解失活的关联已从不同种类的昆虫中得到证实，且被不同学者认为是蜕皮激素 C_{26} 羟基化酶的侯选基因。

本实验首次从家蚕中克隆得到细胞色素 P450 基因 *CYP18A1*，其开放阅读框长 1 623 bp，编码 541 个氨基酸。该基因具有 6 个外显子和 5 个内含子，除与其他昆虫的直向同源基因 *CYP18A1* 有最高的同源性外，还与来自 *CYP2* 家族基因有较高的同源性（32% ~ 35%），其中包括参与类固醇代谢的 P450s（西班牙野兔 *Oryctolagus cuniculus* 的黄体酮-C_{21} 羟基化酶基因 *CYP2C4*，小鼠 *Mus musculus* 的性激素睾酮-7-α-羟基化酶基因 *CYP2A12* 及 16-α-羟基化酶基因 *CYP2B9* 等）。却和脊椎动物细胞色素 P450s 中包含与类固醇合成有关的 *CYP17* 与 *CYP21* 家族基因（Davies *et al*.，2006）的同源性相对较低（27% ~ 31%，25% ~ 28%）。通过比对还可发现该基因和家蚕中与蜕皮激素合成有关的 P450s 同源性则更低（*CYP314*，21%；*CYP315A1*，21%；*CYP302A1*，23%；*CYP307A1*，25%；*CYP306A1*，28%）。对其不同时期与组织表达谱分析发现，该基因在家蚕不同的主要发育变态时期和组织存在一定的表达特异性，在不同发育时期与组织中对家蚕发育可能起着相应的重要调控作用。

蜕皮激素是通过其浓度的高低来调节昆虫的生长发育。目前研究发现昆虫蜕皮激素主要有三种代谢降解途径，其中蜕皮激素的 C_{26} 的羟基化形成蜕皮酸是普遍存在的一种方式之一（Williams *et al*.，1997；Kayser *et al*.，1997）。Kayser 等（1997）通过摇蚊 *Chironomus tentans* 上表皮细胞系的实验证明这一羟基化酶是 P450 单加氧酶。Calvez 等（1976）与 Gu 和 Chow（2005）先后利用放射性免疫测定（radioimmunoassay，RIA）方法定量分析了家蚕体液中蜕皮激素的含量变化，结果均发现其在上簇营茧 2 天左右有相对较高的蜕皮激素峰值。而本实验的表达谱分析表明该基因在此时有相对较高的转录水平，与家蚕体内相应的蜕皮激素峰值时间有一定的一致性，从而进一步印证了以前的研究对该昆虫直向同源基因功能的推断，即蜕皮激素应一样参与了家蚕的 *CYP18A1* 的转录调控，该基因与家蚕蜕皮激素代谢也可能有一定的关系，但这尚需进一步研究与证实。

通过由中日科学家组成的国际家蚕基因组测序联盟（The International Silkworm Genome Sequencing Consortium）完成的家蚕新基因组 9 × 数据库（数据尚未公布）比对，发现家蚕的 *CYP18A1* 和 Halloween 家族中编码 C_{25} 羟基化酶的 *CYP306A1* 位于同一 Scaffold 上串联重复基因，同时又属于昆虫 P450 基因家族中有同一祖先的集团（Clan）Ⅱ（Feyereisen，2006），有几乎相同大小的开放阅读框，它们之间存在基因复制。而且在黑腹果蝇中这二个直向同源基因也串联位于同一染色体上（Tijet *et al*.，2001；Orengo and Aguade，2007），表明它们在这两种昆虫基因组进化过程中仍保持着染色体的同线性，而基因功能发生了分化，*CYP306A1* 参与昆虫的蜕皮激素合成，*CYP18A1* 则可能与昆虫的蜕皮激素代谢有关。有趣的是在信息分析时，我们发现家蚕中还有另外

一个 P450 基因和 *CYP18A1* 的相似性为 39%，也同时表现出与之串联重复的特征，而在黑腹果蝇中未发现，说明在家蚕中发生了进一步的基因复制。本实验通过对家蚕 *CYP18A1* 基因的克隆及其在主要发育变态时期和组织转录活性的研究，为进一步深入探讨这些复制基因在功能与基因组进化方面的意义打下了一定的基础。

参 考 文 献 (References)

Bassett MH, McCarthy JL, Waterman MR, Sliter TJ, 1997. Sequence and developmental expression of CYP18, a member of a new cytochrome P450 family from *Drosophila*. *Mol. Cell Endocrinol.*, 131: 39 – 49.

Calvez B, Hirn M, Dereggi M, 1976. Ecdysone changes in the haemolymph of two silkworms (*Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*) during larval and pupal development. *FEBS Lett.*, 71(1): 57 – 61.

Chavez VM, Marques G, Delbecque JP, Kobayashi K, Hollingsworth M, Burr J, Natzle JE, O′Connor MB, 2000. The *Drosophila disembodied* gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development*, 127: 4 115 – 4 126.

Chen JH, Kabbouh M, Fisher MJ, Rees HH, 1994. Induction of an inactivation pathway for ecdysteroids in larvae of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Biochem. J.*, 301: 89 – 95.

Davies L, Williams DR, Turner PC, Rees HH, 2006. Characterization in relation to development of an ecdysteroid agonist-responsive cytochrome P450, *CYP18A1*, in Lepidoptera. *Arch. Biochem. Biophys.*, 453: 2 – 10.

Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507 – 533.

Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. Comprehensive Molecular Insect Science. Vol. 4. Elsevier, Oxford. 1 – 77.

Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(6): 1 252 – 1 255.

Gilbert LI, 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 215: 1 – 10.

Gu SH, Chow YS, 2005. Analysis of ecdysteroidogenic activity of the prothoracic glands during the last larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58: 17 – 26.

Hurban P, Thummel CS, 1993. Isolation and characterization of fifteen ecdysone-inducible *Drosophlia* genes reveal unexpected complexities in ecdysone regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 7 101 – 7 111.

Kayser H, Winkler T, Spindler-Barth M, 1997. 26-hydroxylation of ecdysteroids is catalyzed by a typical cytochrome P-450-dependent oxidase and related to ecdysteroid resistance in an insect cell line. *Eur. J. Biochem.*, 248: 707 – 716.

Lafont R, Blais C, Beydon P, Modde JF, Enderle U, Koolman J, 1983. Conversion of ecdysone and 20-hydroxy-ecdysone into 26-OIC derivatives is major pathway in larvae and pupae of species from three insect orders. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1: 41 – 58.

Li B, Xia Q, Lu C, Zhou Z, Xiang Z, 2005. Analysis of cytochrome P450 genes in silkworm genome (*Bombyx mori*). *Sci. China Ser. C – Life Sci.*, 48(4): 414 – 418.

Namiki T, Niwa R, Sakudoh T, Shirai KI, Takeuchi H, Kataoka H, 2005. Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: A regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337: 367 – 374.

Nebert DW, Gonzalez FJ, 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 945 – 993.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 12(1): 1 – 51.

Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 279(34): 35 942 – 35 949.

Niwa R, Sakudoh T, Namiki T, Saida K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2005. The ecdysteroidogenic P450 Cyp302a1/disembodied from the silkworm, *Bombyx mori*, is transcriptionally regulated by prothoracicotropic hormone. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 563 – 571.

Omura T, 1999. Forty years of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266: 690 – 698.

Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, Itoyama K, Petryk A, Rybczynski R, Jarcho M, Warren JT, Marqués G, Shimell MJ, Gilbert LI, O'Connor MB, 2006. *Spook* and *Spookier* code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Biol.*, 298: 555 – 570.

Orengo DJ, Aguade M, 2007. Genome scans of variation and adaptive change: extended analysis of a candidate locus close to the *phantom* gene region in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1 122 – 1 129.

Parvy JP, Blais C, Bernard F, Warren JT, Petryk A, Gilbert LI, O'Connor MB, Villemant CD, 2005. A role for hFTZ-F1 in regulating ecdysteroid titers during post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 282: 84 – 94.

Petryk A, Warren JT, Marques G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Villemant CD, O'Connor MB, 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 13 773 – 13 778.

Rewitz KF, O'Connor MB, Gilbert LI, 2007. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: Phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(8): 741 – 753.

Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006a. Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysonebiosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 188 – 199.

Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006b. Developmental

expression of *Manduca shade*, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 247: 166 – 174.

Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006c. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(6): 1 256 – 1 259.

Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 757 – 777.

Scott JG, Liu N, Wen Z, 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C: 147 – 155.

Tijet N, Helvig C, Feyereisen R, 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262: 189 – 198.

Warren JT, Petryk A, Marques G, Jarcho M, Parvy JP, Villemant CD, O'Connor MB, Gilbert LI, 2002. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(17): 11 043 – 11 048.

Warren JT, Petryk A, Marques G, Parvy JP, Shinoda T, Itoyama K, Kobayashi J, Jarcho M, Li Y, O'Connor MB, Villemant C, Gilbert LI, 2004. *Phantom* encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 991 – 1 010.

Williams DR, Chen JH, Fisher MJ, Rees HH, 1997. Induction of enzymes involved in molting hormone (ecdysteroid) agonist 1, 2-dibenzoyl-tert-butylhydrazine (RH-5849). *J. Biol. Chem.*, 272: 8 427 – 8 432.

Williams DW, Fisher MJ, Rees HH, 2000. Characterization of ecdysteroid 26-hydroxylase: An enzyme involved in molting hormone inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 376: 389 – 398.

Wing KD, Slawecki RA, Carlson GR, 1988. RH5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval Lepidoptera. *Science*, 241: 470 – 472.

Xia Q, Cheng D, Duan J, Wang G, Cheng T, Zha X, Liu C, Zhao P, Dai F, Zhang Z, He N, Zhang L, Xiang Z, 2007. Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Genome Biol.*, 8(8): R162 [http://genomebiology.com/2007/8/8/R162].

(责任编辑：黄玲巧)